

## 生物障害ポテンシャル評価手法の確立

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	藤本	尚志
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	松本	恭太



厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)  
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける生物障害対策の強化に関する研究」  
分担研究報告書

研究課題：生物障害ポテンシャル評価手法の確立

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長  
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学 応用生物科学部 教授  
研究分担者 浅田 安廣 国立保健医療科学院 生活環境研究部 主任研究官  
研究協力者 松本 恭太 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

温暖化や湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化により藻類が異常発生し、水道でのカビ臭発生事例が確認されているため、その対策に向けて原因解明が求められている。カビ臭原因物質を産生する主な原因生物として藍藻類があげられるが、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種についてデータ収集を行うと同時にその特徴について整理を行っていく必要がある。

本研究ではカビ臭原因物質が確認された水源から単離された *Pseudanabaena limnetica* および *Microcoleus autumnalis* について培養実験を行い、増殖過程におけるカビ臭の生成について検討を行った。*P. limnetica* の 2-MIB 産生に及ぼす温度の影響が大きいことが明らかとなった。*M. autumnalis* については増殖に及ぼす温度の影響が大きく 25°C で最も増殖速度が大きかった。一方 2-MIB 産生については 25°C で低くなる傾向がみられた。再現性も含めて株間におけるカビ臭産生特性の違い、培養条件の違いによるカビ臭産生の違い等についてさらなる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

温暖化や湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化により水道障害生物が異常発生し、様々な生物障害事例を引き起こしている。その中でも水道水の異臭味被害の一つであるカビ臭発生事例は多くの事業体で確認されているため、その原因解明とそれに合わせた対応が早急に求められる。

カビ臭の原因物質はジェオスミンと 2-MIB(2-メチルイソボルネオール)であり、それらを産生する主な原因生物として藍藻類があげられる。しかし、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種について、形態、16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列に関するデータ収集を行うと同時に、その特徴について整理を行っていく必要がある。

そこで本研究課題ではカビ臭原因物質が確認された水源から単離された藻類株について培養実験を行い、増殖過程におけるカビ臭の生成について検討を行った。特に、温度条件に着目し、カビ臭生成に及ぼす温度の影響について検討を行った。

B. 研究方法

1) 供試藻類および培養方法

供試藍藻類として、A 沼から単離された *Pseudanabaena limnetica* WILD-6 株、河川 B で単

離された *Microcoleus autumnalis* WILD-52 株を用いた。*P. limnetica* は、200ml 容三角フラスコを用いて培養を行った。CT 培地 100ml を入れて、オートクレーブ滅菌後、初期糸状体数が 500 糸状体/ml となるように接種した。100  $\mu$ m を 1 糸状体とした。20, 25, 30°C で培養を行った。照度は 2000 lx (12 時間明/12 時間暗) とした。各条件につき 3 本ずつ試験を行った。5 日に 1 回程度糸状体数を Fuchs Rosenthal 血球計数盤を使用し光学顕微鏡により計測した。

*M. autumnalis* はねじ蓋付き試験管に CT 培地を 10ml 分注し、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 10mm/ml となるように接種した。照度は 2000 lx (12 時間明/12 時間暗) とした。温度条件は 15°C, 20°C, 25°C, 30°C とした。*M. autumnalis* は付着性があり、顕微鏡観察による正確な菌数のカウントが困難であるため、増殖量を Chl.a 量により評価した。

1 週間おきに Chl.a の測定を行った。3 本の試験管を用いて行った。Chl.a の測定において、試験管内の試料(液部)を 25mm の GF/C で吸引ろ過し、そのろ紙を *M. autumnalis* が付着した状態の試験管内に戻し、0.2% MgCl<sub>2</sub> 含有 90% メタノールを 10ml 加えた。遮光した状態で 65°C の湯浴で 30 分加熱することにより Chl.a を抽出した。抽出液を遠心チューブに移し、2000rpm で 15 分間遠心分離した後、上澄み液を吸光度計で計測した。Chl.a 量の測

定は Shen らによったり。

## 2) カビ臭物質の測定

糸状体数のカウント, Chl. a の定量と同時にカビ臭物質の測定を行った。*P. limnetica* については培養液 0.3ml と CT 培地 1.4ml を 1.5ml 容エッペンに入れたもの, 培養液を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過したろ液を 1.5ml 容エッペンに入れ満水にしたものについて測定を行った。

*M. autumnalis* については試験管 3 本について測定を行った。培養を行ったねじ蓋付き試験管内の液部をファルコンチューブに移し 3000rpm で 15 分間遠心分離を行った。上澄みを別のファルコンチューブに移し, それを CT 培地で満水にした (溶存態 2-MIB 測定用試料)。上澄みを取り除いたファルコンチューブに少量の CT 培地を加えボルテックスし, 底に沈殿した菌体をねじ蓋付き試験管内に移した。そして試験管を CT 培地で満水にした (菌体内 2-MIB 測定用試料)。このようにして菌体部と液体部に分離した状態でそれぞれ SPME-GC/MS 法に供した。

SPME-GC/MS システム (Agilent 5977B GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS Robotec Pro, Gerstel) を用いて, ジェオスミン・2-MIB 濃度を測定した。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1) *P. limnetica*

各温度において 0 日目から 9 日目までが対数増殖期であった (図 1)。30°C よりも, 20°C, 25°C のほうが比増殖速度がやや大きいことが明らかとなった。9 日目以降は定常期となり, 培養温度による最大増殖量の違いは見られなかった。2-MIB 総濃度は 25°C において最も高く推移した (図 2)。20°C よりも 30°C のほうが 2-MIB 総濃度が高く推移した。これらの結果から温度による影響が大きいことが明らかとなった。

溶存態濃度について, 温度条件による大小関係は総濃度と同様であった (図 3)。培養後期のほうが高まる傾向がみられた。総濃度に占める溶存態濃度の割合は, 20°C と 30°C において培養後期に高まる傾向がみられ, 最大で 50% を超えていた (図 4)。一方 25°C では培養期間を通じて大きな変化は見られず, 20~40% の間を推移した。一糸状体あたりの 2-MIB 含有量は 30°C の 9 日目に特異的に高まり 0.0034ng/糸状体であった (図 5)。25°C では培養後期に他の温度に比べて明らかに高まり, 最大 0.0017ng/糸状体であった。20°C, 30°C を比較すると, 30°C のほうが増殖初期から高く推移したが, 培養後期では同程度となった。

### 2) *M. autumnalis*

初期の増殖速度は 25°C が最も速く, 次いで 30°C, 20°C, 15°C であった (図 6)。20~30°C では 3 週目で定常期になったのに対し, 15°C では 4 週目で定

常期になった。定常期の増殖量には違いが見られなかった。

2-MIB の総量は 20°C の一回目の実験では 14 日目に最大となり, その後減少がみられたが, その他の条件では, 培養日数とともに高まっていく傾向がみられた (図 7)。増殖が良好であった 25°C では 2-MIB 総量は低く推移した。溶存態 2-MIB 量は培養日数の経過とともに高まり, 25°C および 30°C において最も高まった (図 8)。2-MIB 総量に占める, 溶存態 2-MIB 量の割合は, 各温度で 14 日以降 20% 程度以下で推移したが 25°C において, 28 日目に 30% を超えた (図 9)。20°C において再現性が得られず, さらなる検討が必要と考えられた。

### 3) 二種間の比較

*P. limnetica* のほうが速やかに増殖し, 定常期に達するまでの時間が短いことが明らかとなった。培養方法の違いも影響している可能性が考えられた。*P. limnetica* は 25°C において, 2-MIB 濃度が最も高まったが, *M. autumnalis* は 25°C において 2-MIB 総量は低く推移し, 種類の違いにより 2-MIB 産生の温度特性が異なることが示唆された。*P. limnetica*, *M. autumnalis* とともに, 溶存態の 2-MIB は培養日数の経過とともに高まり, 各温度における溶存態 2-MIB の最大濃度はそれぞれ, 30000~80000ng/L, 20000~120000ng/L であった。両藻類ともに温度による違いはみられるが, 藻類間で溶存態 2-MIB の産生ポテンシャルに大きな差異はないと考えられた。これについては今後藻体量あたりの溶存態 2-MIB 放出量の評価が必要と考えられる。定常期における 2-MIB 総濃度 (総量) に占める溶存態濃度 (溶存態量) の割合は, *P. limnetica* のほうが高い傾向がみられた。

## E. 結論

*P. limnetica* の増殖曲線より, 増殖に及ぼす温度の影響は小さいが, 2-MIB 産生に及ぼす温度の影響は大きいことが明らかとなった。*M. autumnalis* については増殖に及ぼす温度の影響が大きく 25°C で最も増殖速度が大きかった。一方 2-MIB 産生については 25°C で低くなる傾向がみられた。再現性も含めて株間におけるカビ臭産生特性の違い, 培養条件の違いによるカビ臭産生の違い等, さらなる検討が必要と考えられた。温度や培養時期によって 2-MIB 産生が異なることから, それらの現象を理解するために, 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量の評価等の必要性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

- 1. 論文発表  
該当なし
- 2. 学会発表  
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

- 1. 特許取得  
該当なし
- 2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1) Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M: Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*, Environ. Sci. Pollut. Res., Vol. 28, pp.177–184, 2021.

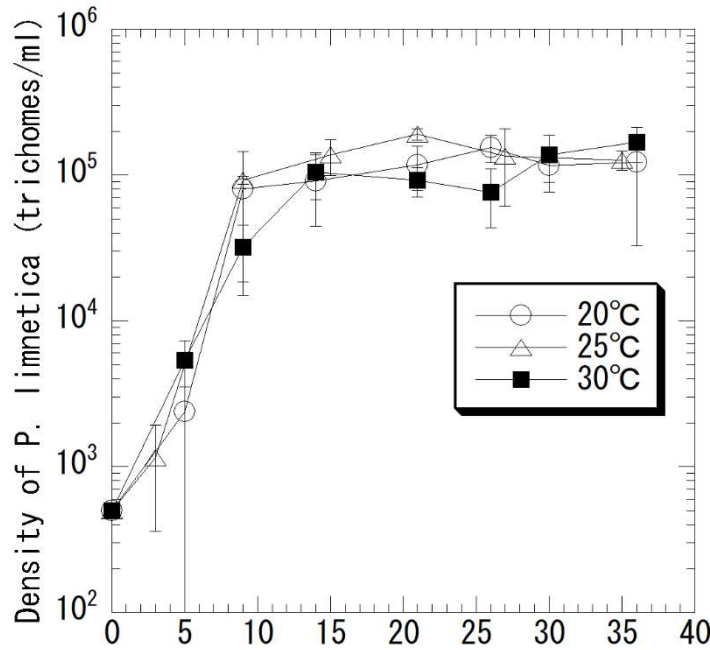


図1 *P. limnetica* の各温度における増殖曲線

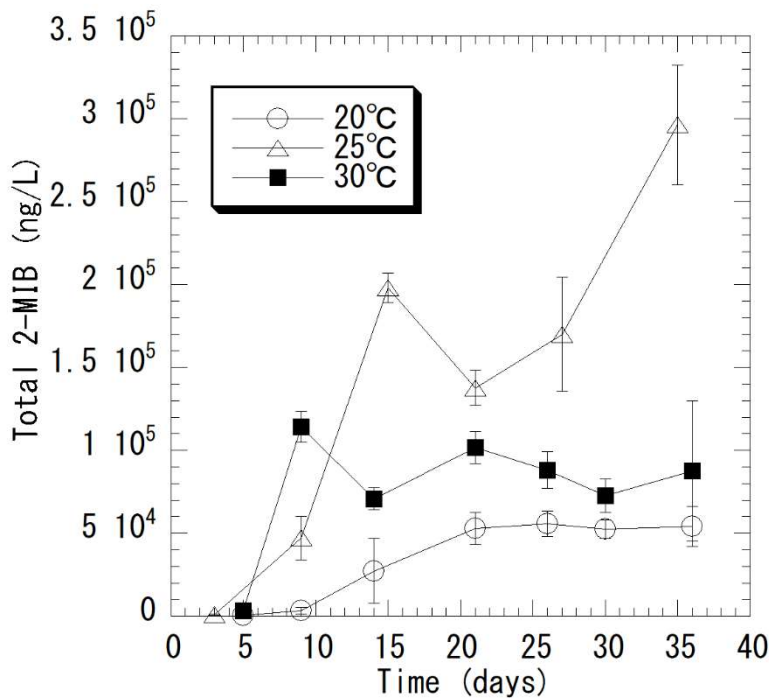


図2 各温度における2-MIB総濃度の推移(*P. limnetica*)

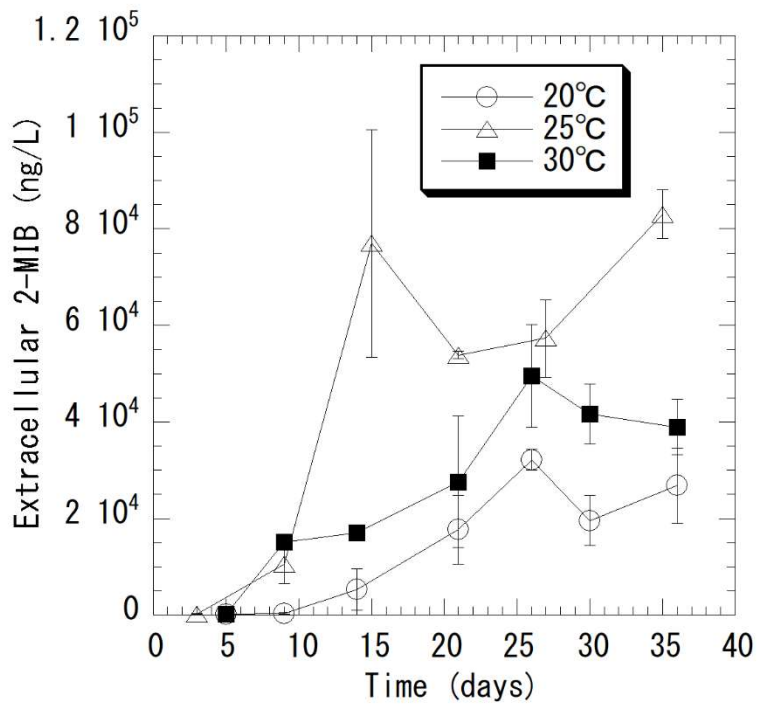


図3 各温度における2-MIB溶存態濃度の推移 (*P. limnetica*)

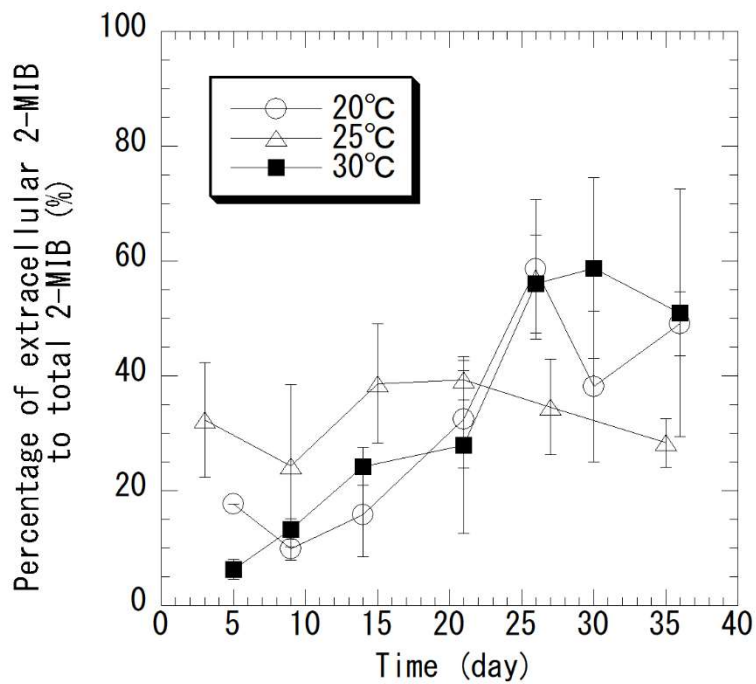


図4 各温度における2-MIB溶存態濃度の総濃度に占める割合の推移 (*P. limnetica*)

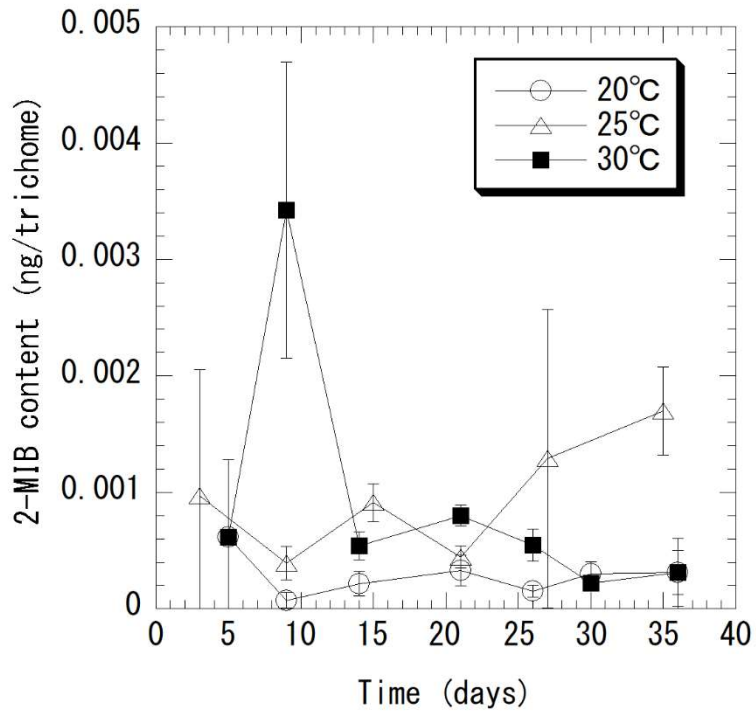


図5 各温度における 2-MIB 含有量の推移 (*P. limnetica*)

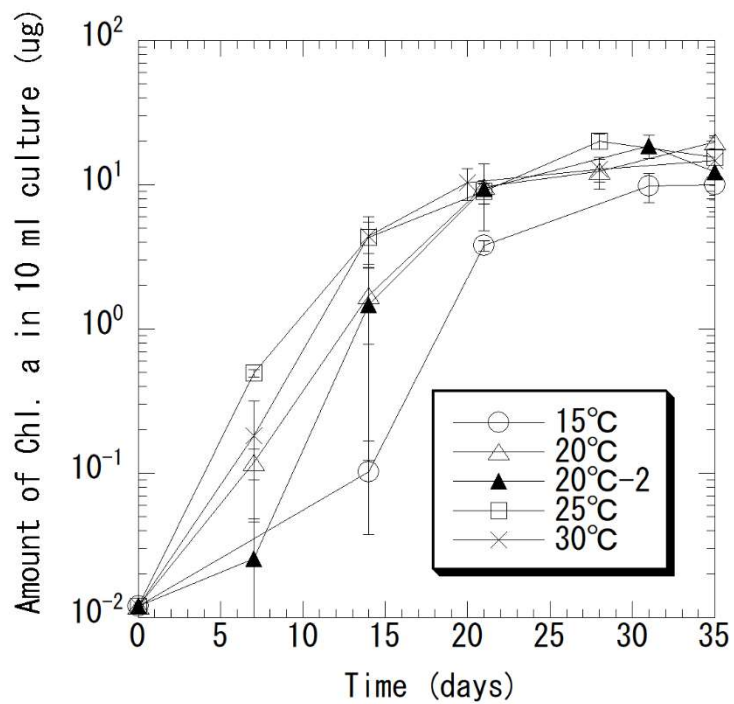


図6 各温度における 10ml 培養液中の Chl. a 量の推移 (*M. autumnalis*)

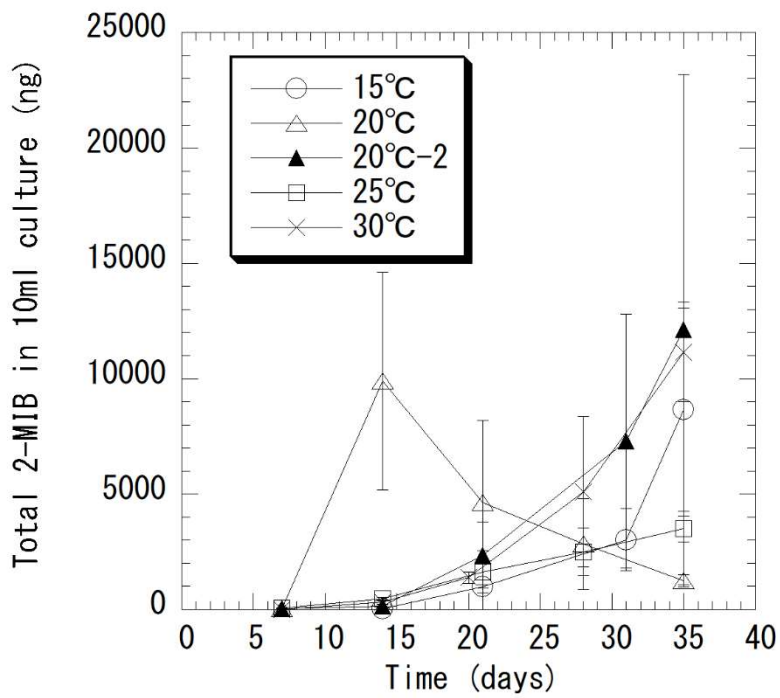


図7 各温度における 10ml 培養液中の総 2-MIB 量の推移 (*M. autumnalis*)

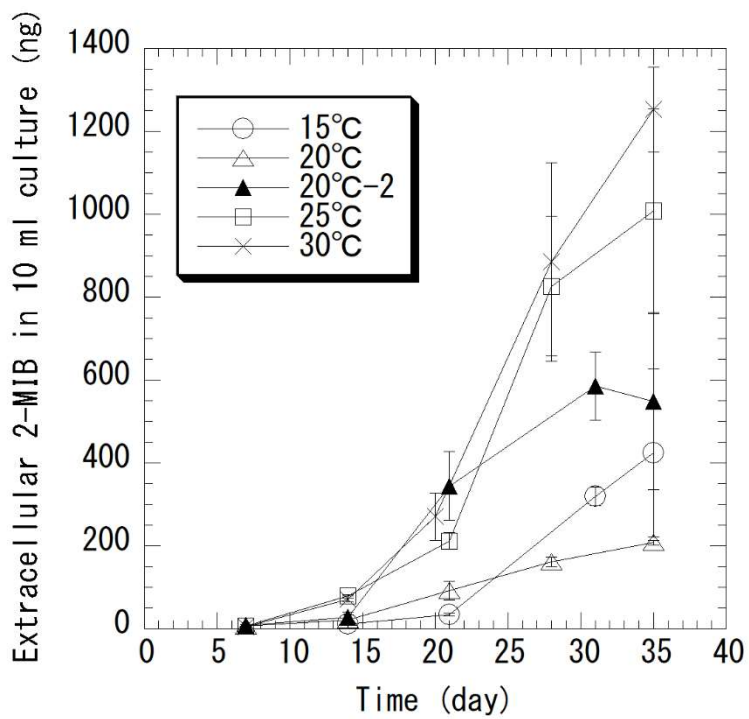


図8 各温度における 10ml 培養液中の溶存態 2-MIB 量の推移 (*M. autumnalis*)



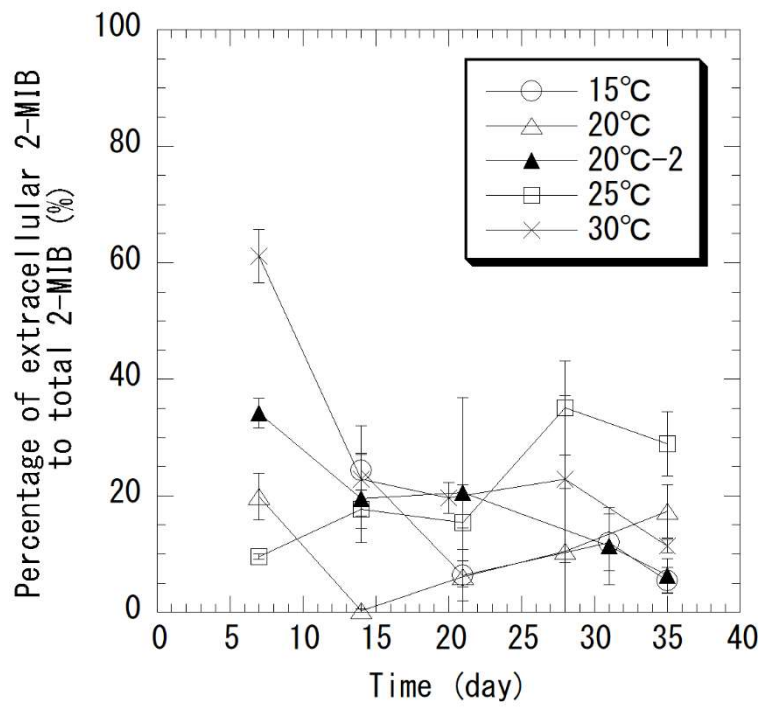


図9 各温度における溶存態 2-MIB 量の総量に占める割合の推移 (*M. autumnalis*)

